

マウス赤白血病細胞の分化における負の制御タンパクIdの関与

著者	東海林 互
学位授与機関	Tohoku University
URL	http://hdl.handle.net/10097/54911

1

博士論文

マウス赤白血病細胞の分化における
負の制御タンパク Idの関与

東北大学大学院医学研究科外科学系専攻
(東北大学抗酸菌病研究所 外科学部門)

東海林 互

序論

我々の身体は多種多様の細胞からなっているが、それは一個の受精卵が、DNAに記録された遺伝情報にしたがって適切な数だけ増殖し、また適切な段階で分化を行なった結果の集大成である。この遺伝情報になんらかの理由で異変が起き、細胞が正しい分化、増殖のプログラムから逸脱した場合、個体にとっては奇形や遺伝病、さらに癌などの重篤な疾病の原因となりうるということが知られてきている。このような観点から、細胞の分化、増殖が遺伝情報によりどのように制御されているかを解明することは、非常に大きな生物学的興味の対象であるばかりでなく、医学的にも新しい境地を切り開き、疾病の診断や治療に結びつく重要なものと確信される。私は、増殖している細胞がどのようなプロセスで分化の方向に向かう決定をし、自からの運命転換を行なっているのか、という事象を分子レベルで明らかにしていきたいと考えた。

今回私が研究材料に用いた血液細胞の分化系は、1種類の造血幹細胞が赤血球、白血球をはじめとして血小板、種々の免疫担当細胞など、それぞれ異なった形態、固有の機能をもった細胞に分化していく系で、そのバラエティに富んだ分化の方向性は、1個の卵細胞が個体を形成するプロセスにも例えられるほどである。また、造血幹細胞がさまざまな方向へ分化しながらも、自身と同じ能力をもつ幹細胞を複製することにより造血システムを生涯にわたって維持していることや、未分化な血球細胞が増殖しながら分化して血球量を増やす一方で、成熟した血球細胞は分裂を停止しやがて死んでいくことからわかるように、分化と増殖がきわめて厳密にコントロールされている系であり、旧くから細胞分化の優れたモデル系として多くの研究がなされてきた。なかでも赤芽球の分化過程では、ヘモグロビンなどいくつかの特徴的なタンパクが合成されるようになるので、これらの分化マーカーとなるタンパクの発現制御のメカニズムに注目して分化という生命現象を解析することが可能であり、また、培養細胞による分化モデルであるマウス赤白血病細胞（以下MEL細胞と略す）が存在するので、分化方向へシフトする均一な細胞集団をもちいた生化学的、また分子生物学的な解析に適している[Friend et al., 1970]。MEL細胞は、分化の途中段階にある前赤芽球細胞がトランスフォームしたと考えられていて、試験管内でジメチルスルホキシド（以下DMSOと略す）等の誘導剤を添加すると、赤血球方向へ分化をはじめ、3～4日の潜伏期間をおいてヘモグロビンをはじめとする赤血球特異的分化マーカーを産生するようになる。DMSOによる分化誘導のメカニズムはあまりよくわかっていないが、誘導剤の添加直後に細胞内Caイオンの増加[Bridges et al., 1981][Faletto et al., 1985]Phosphatidylinositol turnoverの減少[Faletto et al., 1985]が見られることから、細胞膜の変化によりなんらかの細胞内シグナルが伝達されていること、また、分化マーカー発現までの潜伏期間（latent period）に*c-myc*や*c-myb*などの癌遺伝子の発現の変動が見られ、高発現させると分化の阻害がみられることから、これらの癌遺伝子が分化のプロセスで重要な役割を果たすことが考えられている。特に*c-myc*はMEL細胞が分化方向へcommitされる場面に参与しており、増殖と分化の転換点で重要な役割を果たすことが示されているが、その具体的な分子機構は未解明の問題である。

一般に、未分化な細胞が分化形質を発揮する細胞へと変換するためには多くの遺伝子産物が動員されるが、これら遺伝子産物は階層性をもって、あるいはネットワークを形成して、分化のプログラムを進行させている。この未分化から分化への変換には、そのなかで鍵をにぎり、中心的な役割を演じる遺伝子（Master Gene）があると予想されるが、1989年にWeintraubらが単離した*myoD*は、強制発現により線維芽細胞を筋細胞に分化させる遺伝子であり、まさに哺乳動物で初めて発見された分化のMaster Geneであった[Davis et al., 1987]。タンパクの構造と機能解析から、*MyoD*は特異的塩基配列（E-boxと呼ばれる）を認識してDNAに結合する転写因子であり、約70アミノ酸からなるタンパクモチーフ「Basic-HLH」がこのタンパクを特徴付けていることがわかってきた[Murre et al., 1989]（図1A,B,C）。

Basic-HLHモチーフは、N末側に塩基性領域 (Basic Region)、その隣のC末側に約15アミノ酸からなる2つの両親媒性の α -Helixと、それを結ぶ短いループ部分よりなるヘリックス・ループ・ヘリックス (HLH) 構造からなっており、Basic RegionはDNAとの結合に、HLHはタンパク-タンパク2量体形成に必要な領域である。MyoDはHLHを介して、自分自身とのホモダイマー、または他のHLHタンパクとのヘテロダイマーを形成することができるが、なかでもE12/E47という、種々の細胞で広くまた恒常的に発現しているBasic-HLHタンパクとヘテロダイマーを作ったときに2量体の形でDNAに強く結合し、筋特異的遺伝子の転写を活性化することができる[Murre et al., 1989][Lassar et al., 1991][Weintraub et al., 1991]。またこれとは反対に、DNA結合に必要なBasic RegionをもたないHLHタンパクIdが存在し、MyoDとヘテロダイマーを形成することによって、またはMyoDからE12/E47を取り上げることによってDNAへの結合能を失わせ、MyoDの転写活性を減少させることができる[Benezra et al., 1990][Pongubala et al., 1991][Jen et al., 1992]。このIdは未分化な状態で多く発現しているが、分化後に発現が減少しており、HLHを介したタンパク-タンパク結合によりMyoDの機能は制御されているのである。最近の研究からはHLHタンパクによる分化の制御は筋細胞にとどまらず、B細胞、骨髄細胞、神経細胞などの分化系でも示されており[Wilson et al., 1991][Kreider et al., 1992][Johnson et al., 1992]、またMyoDとIdによく似た関係がショウジョウバエの感覚神経の形成をつかさどるBasic-HLHタンパク、Achaete-Scute-Complex (AS-C) とその負の調節因子Extramacrochaetaeに見られること[Caudy et al., 1988][Ellis et al., 1990][Garrel et al., 1990]を考えると、HLHモチーフをもったタンパクは種々の細胞系列に広く分布し、共通して細胞分化の制御に重要な役割を関わっていることが予想される。筆者らはとくに、赤芽球の分化モデルであるMEL細胞で、HLHタンパクのNegative RegulatorであるIdがMEL細胞の分化誘導直後に急速に減少している[Benezra et al., 1990]ことに注目した。果たして、IdはMEL細胞の分化を制御しているのだろうか。そして赤芽球分化の系にもMyoDのような、未知のBasic-HLHタンパクが存在するのだろうか。本研究では、Idを中心にMEL細胞分化の分子機構の解明を目指していきたい。

結果

1. Id導入細胞の作成

MEL細胞では分化誘導によりIdのmRNAの急速な減少が見られる (図2) が、このことは骨格筋分化におけるMyoDのような、分化を促進するBasic-HLHタイプの転写因子の存在を予想させる。もし、そのような転写因子が存在するならば、MEL細胞の分化誘導後にもIdを発現させ続けることによって転写因子のDNAへの結合阻害がおこり、分化や増殖になんらかの影響が見られるであろう。そこで私は、外来性のIdを人為的にMEL細胞中に高発現させる系を作成し、IdのMEL細胞分化における役割を検討することにした。多くの遺伝子導入実験では、導入する遺伝子をウィルスのLTRや β -actinなど恒常的な発現プロモーターの制御下に置くことが一般的であるが、MEL細胞の分化の程度がクローン間でばらついていることを考慮すると、誘導可能なプロモーターをもちいて、同一クローン内での導入遺伝子の高発現状態、発現していない状態を作り出して比較したほうが分化に与える影響を調べるのに有利である。そこで筆者は、IdのcDNAをヒトメタロチオネインプロモーター (HMTIIdel) につなぎ、さらにネオマイシン耐性遺伝子を恒常的に発現させるようなデザインのプラスミド (pMT-Id) を作成した (図3)。メタロチオネインプロモーターは細胞内の重金属の濃度に反応して遺伝子の転写を活性化するプロモーターであり、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} などを培地中に添加することにより下流につないだIdの発現を誘導することができる。また、ネオマイシン耐性遺伝子を構成的に発現させるユニットをプラスミドに組み込むことによって、遺伝子導入細胞を容易に選択することを可能にした。このプラスミドをプロトプラスト融合法によりMEL細胞のDS19/3株に導入して、約2週間、100 μ Mのネ

オマイシン含有培地にて培養した。親株はネオマイシン添加培地では死滅するので、このとき生き残った細胞はネオマイシン耐性遺伝子が染色体上に組み込まれたことを示しており、また同時にId遺伝子が染色体上に組み込まれた可能性が高いことになる。このような細胞を単クローン化し、48株の独立した安定変異株を得た。

2. 導入したIdの高発現はMEL細胞の分化を阻害する

作成した48株の安定変異株のうち12株を適当に選択して、Idの分化への影響を調べた。MEL細胞を分化誘導培地で培養すると数日で赤血球方向へ分化しヘモグロビンを産生するようになるので、分化誘導後4日目の細胞をベンチジン染色してヘモグロビンを染め、全細胞に対するベンチジン陽性細胞の占める割合を分化率とした。導入遺伝子Idは Zn^{2+} により発現を誘導できるので、分化誘導培地中に Zn^{2+} を添加した時と、添加しない時の分化率の比較によって、分化に対するIdの影響を検討できる。各クローンの Zn^{2+} 160 μ M添加時の分化率の、非添加時の分化率に対する比を求め、図4にその結果を示した。

親株であるDS19株もあらためてクローニングし、対象群としたところ、 Zn^{2+} の添加による分化率への影響には多少のばらつきがみられ、(Zn^{2+} 添加時の分化率) / (Zn^{2+} 非添加時の分化率) は0.7~1.1の間に分布した(図4 Lane A)。このことは Zn^{2+} 自身の作用による分化率への影響が軽度であることを示している。一方、遺伝子導入操作を行なった安定変異株では(Zn^{2+} 添加時の分化率) / (Zn^{2+} 非添加時の分化率) の分布が0.4~0.9と、分化阻害が強くなる方向へ拡大し、なかでも0.5を割るようなクローンが12クローン中4クローン存在した(図4 Lane B)。導入株のなかに阻害の強いクローンと弱いクローンのあることは、導入遺伝子の染色体への組み込まれかたの違いによって、 Zn^{2+} を添加しても導入遺伝子の発現が弱い、全く発現しないか、もしくは不完全な形で組み込まれているようなクローンが存在するためと思われる。

そこで、導入株のなかから、(Zn^{2+} 添加時の分化率) / (Zn^{2+} 非添加時の分化率) が0.5以下の分化阻害群と、0.8~0.9の非阻害群の2群よりそれぞれ数クローンを選び、 Zn^{2+} の添加に依存したIdの発現がみられるか、ノザンブロットを行なって確認した。すると分化阻害群では全てのクローンで、160 μ Mの Zn^{2+} 添加時に、非添加時の10~20倍のIdのmRNAが速やかに誘導されたが、非阻害群では Zn^{2+} 添加によるId遺伝子の発現誘導が全くみられなかった(図4 Lane C, D 図5 A, B)。さらに、分化阻害のかかるクローンでは、タンパクレベルでIdの発現が起こっていることが、抗Id血清を用いた免疫沈降実験により確認された(図6)。以上の結果から、Idが誘導可能な形で導入されたクローンのみが Zn^{2+} に依存してMEL細胞の分化を阻害することが結論された。

3. IdはMEL細胞分化の初期段階を制御する

次に、Idが分化制御を行なう時期を検討することを目的として、分化刺激後、異なったタイミングでIdの発現を誘導し、その発現時期のちがいによる阻害効果の変化を観察した。図7に、Idの発現が観察された代表的な安定変異株、DSId342株を用いた実験結果を示す。分化誘導直後から6時間以内にIdの発現を誘導した場合には大きな阻害効果が得られたが、12時間目以降にIdの発現を誘導した場合には急速にその阻害効果が小さくなった。すなわち、分化誘導後のIdの速やかな減少が細胞分化に重要であることが判明した。このことは、IdがMEL細胞分化において、分化プログラムの初期段階を制御する、いわば分化決定因子として働いていることを示唆している。

4. Idはヘモグロビン以外の分化マーカーの発現も抑制する

これまでの実験結果から、Idを高発現させたMEL細胞では分化の阻害が起こることが明らかとなったが、ここでいう「分化」とは、ヘモグロビンの産生が指標になっており、「Idは赤血球分化マーカーの一つであるヘモグロビンの産生を抑制した」と言い換えるこ

とができる。このときヘモグロビン以外の分化マーカーの発現はどうなっているのだろうか。もし複数の分化マーカーの発現に対してIdが抑制的に働いていれば、「IdによるMEL細胞分化の阻害」はより確かなものになるであろう。これを検証するために、Idの発現が確認された安定変異株、DSId342株を用いて、 Zn^{2+} 存在下または非存在下で分化誘導後、経時的にRNAを調製してノザンプロットングを行なった。プローブには、 β -globin、Glycophorin#、ALAS-E# (Erythroid specific isoform of δ -aminolevulinate synthase) の3種の分化マーカーを用意した。 β -globinはヘモグロビンのサブユニット、Glycophorinは成熟赤血球に特異的に存在する膜タンパク、ALAS-Eはヘム生合成の律速酵素であり、それぞれMEL細胞の分化により発現の増加がみられる遺伝子である。さらにもう一つ、分化マーカー遺伝子ではないが、癌遺伝子c-mycをノザンプロットのプローブに加えた。c-mycは分化誘導後に発現が2相性に減少し、Idと同様高発現によりMEL細胞の分化を阻害することが知られているが、それは分化の決定、分化マーカー遺伝子の発現という2つの段階に作用しており[Ohmori et al., in press]、分化のプロセスのなかで特に重要な位置付けをされている遺伝子である。Idによる分化阻害が起こっているときのc-mycの発現パターンを観察することにより、c-MycとIdの2つの分化阻害因子の階層性を検討しようと考えた。

結果は図8に示すが、 Zn^{2+} によりIdの発現を誘導した時に、 β -globin、Glycophorin、ALAS-Eともに50%程度の発現抑制がみられ、Idによる分化の阻害を確かなものとした。一方c-mycは発現のパターンには変化がなく、Idによるc-mycの発現制御の可能性は否定された。

5. Idを導入した安定変異株の核抽出液では E box結合活性の減少がみられる

MEL細胞の分化がIdにより阻害されるという実験結果は、赤芽球の分化系にも骨格筋分化の系と同じような、Basic-HLHタンパクによる分化制御のシステムが存在するという、本研究の作業仮説を強く支持するものである。すなわち、MyoDのような分化にPositiveに作用するBasic-HLHタンパクがMEL細胞中に存在していて、Idはこれを制御することによってその分化決定因子としての機能を発揮している可能性が高い。そこで私は、MEL細胞分化におけるBasic-HLHタンパクの挙動を検討するべく、Basic-HLHタンパクが共通に認識するDNA上の塩基配列、E-box (CAGGTG) を含むオリゴDNAをプローブを用いて、MEL細胞の核抽出液に対するゲルシフトアッセイを行なった。ゲルシフトアッセイは、標識したDNA断片と、そのDNAに結合可能なタンパク溶液とを反応させて電気泳動にかけ、安定なDNA-タンパク複合体の移動度が、標識したDNA断片単独より遅くなることを利用して、目的のDNAに結合するタンパクの量や種類を検出する方法である(図9)。このアッセイにより、もし分化の進行にともなって結合活性の増加する核内因子が検出できれば、MEL細胞の分化に促進的に作用するBasic-HLHタンパクの存在がさらに強固に支持されることになるであろう。

核抽出液は、Id導入株DSId342を Zn^{2+} の存在下、または非存在下で分化誘導し、経時的に調製した。これと ^{32}P で標識したオリゴDNAとを反応させ、電気泳動した結果が図10Aである。2種のDNA-タンパク複合体の存在を示す2本のバンドが観察され、そのうち泳動度の遅いバンドにDNA結合活性の変化がみられた。すなわち図10Aの上のバンドに注目すると、 Zn^{2+} 非存在下では、分化誘導後4日目にDNA結合活性の増加が見られているが、 Zn^{2+} によりIdの発現を誘導したときには分化誘導後の結合活性の増加が見られていないという結果が得られた。

次に、ゲルシフトアッセイで観察される2種のDNA-タンパク複合体を示すバンドのうち、上方のバンドでのみ見られたDNA結合活性の変化が、本当にIdの発現量に依存して起こったものかどうかを確認するために、大腸菌で大量に産生させたIdタンパクを、in vitroでMEL細胞の核抽出液に加え、図10Aと同様の変化が見られるかを調べた。核抽出液は図10AでDNA結合活性の増加が観察された Zn^{2+} 非存在、分化誘導後4日目のサンプルを用い、またin vitroで添加するIdタンパクは、大腸菌で産生したタンパクの可溶性と精製の容

易さを得る目的から、Glutathione-S-Transferase (GST) とIdの第80番アミノ酸からC末側 (HLHを完全に含む Δ Id) との融合タンパクを作成し、T7ポリメラーゼを用いた系により産生した。この融合タンパク (GST- Δ Id) が、In vitro transcription-translation法により調製されたMyoDと特異的に結合することを免疫沈降実験により確認したのち、核抽出液に加えて30°C、20分保温してゲルシフトアッセイを行なった。図10Bはその結果であるが、図10AでDNA結合活性の変化を観察した上方のバンドは、In vitroで核抽出液と反応させたGST- Δ Idの量に依存してやはり減弱がみられている。すなわち図10Aで観察されたDNA結合活性の変化は確かにIdの発現量の増加によるものだということが確認された。以上の結果は、MEL細胞の核内にIdによって制御されるBasic-HLHタンパクが存在することを示すものである。

6. MEL細胞の核抽出液中には Idと結合可能な約 30KDのタンパクが存在する

これまでの実験結果から、IdがMEL細胞の分化を制御していることが明らかとなり、また赤血球分化に促進的に作用するBasic-HLHタンパクの存在が強く示唆されたが、このような転写因子が実際に存在するならばHLHを介してとIdと結合するはずであり、この結合を利用した、ウェストウェスタン法によるクローニングが可能と思われる。この方法はあるタンパクプローブと結合しうるタンパクのcDNAをクローニングする目的で近年開発された方法であるが、これまでにc-Mycと結合するMax (Myc associated X protein) [Blackwood et al., 1991]、HIV Tatと結合しうるTBP-1 (Tat binding protein) [Neblok et al.]、さらにRBとの結合を利用したE2Fのクローニング[Healin et al., 1992][Kaelin et al. 1992]がこの方法によりなされており、この方法が非常に有用であることが示されている。私はIdと結合する転写因子の候補を、核抽出液中よりサーベイすることを目的として、ウェストウェスタンプロットを試みた。図11にその概略を示す。まずMEL細胞の核抽出液をSDS-PAGE電気泳動して、タンパクを分子量により分離する。これをニトロセルロースメンブレンに転写し、メンブレンに大腸菌で産生したIdタンパクを結合させる。このプローブとして用いるIdには目印となるように、たとえばGST (Glutathione-S-Transferase) タンパクなどを融合させておく必要があるが、今回の実験には、図7のゲルシフトアッセイで用いたものと同様に、MyoDと特異的に結合することを免疫沈降法で確認した融合タンパク、GST- Δ Idを用いた。このプローブと結合反応させたメンブレンをウサギ抗GST血清 (一次抗体) で処理し、さらにPeroxidase-conjugated Anti-Rabbit IgG (二次抗体) を使って発色反応をおこさせることによって、Idと結合可能なタンパクの数と量、そして、およその分子量を明らかにすることができるのである。

その結果が図12である。Lane1はGSTタンパクをプローブにしているが、結合し得るタンパクのシグナルは得られていない。Lane2で用いたプローブ、GST-wbMycは、c-MycのC末端にあるタンパク結合ドメイン (Basic-HLH-Lz部分) とGSTとの融合タンパクで、1991年にEisenmannらが発表した、c-Mycの結合タンパクMaxを釣り上げたプローブと同様のデザインである[Blackwood, 1991 #6]。このプローブを用いるとMaxと同じサイズ (約20 kDa) のシグナルがみられており、本実験のよいポジティブコントロールとなっている。Lane3ではGST- Δ Idをプローブにしたところ、SDS-PAGEで約90kD、80kD、30kDの位置に、Idに結合するタンパクのシグナルが観察された。特に、30kDのシグナルは、図11 Lane1、2ではみられておらず、Idに特異的に結合するタンパクが核抽出液中に存在することを示している。これらのタンパクは、血球分化に関与するBasic-HLH転写因子の候補と考えることができ、今後、ウェストウェスタン法によるdirect cloningを行なうことによってこのタンパクの実体を明らかにしていきたいと考えている。

考察

赤芽球分化に関与する Basic-HLHタンパクが存在する

Basic-HLHタンパクは、筋細胞をはじめとして、神経細胞、B細胞、骨髄細胞などさまざまな種類の細胞系列で分化に関与している転写因子のファミリーを形成しているが、本研究によってIdの高発現がMEL細胞の分化を阻害することが示され、赤芽球分化においてもBasic-HLHタンパクの関与のあることが確信されるものとなった。IdによるMEL細胞の分化阻害は、ヘモグロビンの産生を指標にしたBenzidine Assayで約50%とさほど大きくはなかったものの、分化の初期過程への関与が強く示唆されており、赤芽球分化において重要な役割を果たしているものと予想される。これまでにBasic-HLHモチーフをもったタンパクは多数クローニングされているが[Olson et al., 1990][Henthorn et al., 1990][Begley et al., 1992][Hu et al., 1992]、中でも、ヒト白血病細胞の染色体転座部位から同定された遺伝子の一つ、SCLは、発現が赤血球系、マスト細胞、幼若な骨髄細胞に限られていること、MEL細胞の分化誘導後にいったん減少し、その後増加するという発現パターンを示すことから、赤芽球分化に関与するBasic-HLHタンパクの一つの候補と考えられている[Green et al., 1991][Begley et al., 1991]。しかし最近になって、Greenらはヒト白血病細胞株K562にSCLのantisenseを発現させたところ増殖能が低下し、赤血球方向への分化の促進がみられたという報告をしており[Green et al., 1991]、このことは、我々の想定しているBasic-HLHタンパクとは逆に、SCLが細胞増殖を促進させ、細胞を未分化な状態にとどめる働きを持つことを意味している。またSCLは、Idにより不活化されるBasic-HLHタンパク、E12/E47とは結合しないという報告もあり[Visvader, 1991]、本研究で存在が示された赤芽球分化に促進的に働くBasic-HLHタンパクと、SCLは違うものである可能性が高い。

赤芽球分化に促進的に働くBasic-HLHタンパク同定のための一つの戦略として、タンパクプローブを用いたウェストウェスタン法による直接クローニングが挙げられる。本研究で、MEL細胞の核抽出液中に、Idと結合可能な約30kDaのタンパクが存在することが示されている(図11)が、このタンパクはMyoDとも、E12/E47とも、さらにSCLともサイズの上で異なっていることから、これまでに知られていない新しいBasic-HLHタンパクであることが期待される。今後、MEL細胞の発現ライブラリーの作成、ウェストウェスタン法による直接クローニングを行なうことによってこのタンパクの実体を明らかにしていきたい。

MEL細胞の細胞株によって Basic-HLHタンパクの分化への寄与が異なっている

最近、Idと同様にBasic RegionをもたないHLHタンパクがクローニングされ、Id2、HLH462(=Id3)と命名された[Sun et al., 1991][Christy et al., 1991]。それらのタンパク結合の特異性はId1(ここでは最初にクローニングされたIdをId1と呼ぶ)と同じにE12/E47に強く、MyoDに弱く結合するものであったが、Sunらは、MEL細胞の745-PC3-A21株ではId2の発現が多いが、Id1の発現はほとんどないことを報告している。一方、BenezraらはMEL細胞のF4N株でId1の発現が分化誘導前で多く、分化誘導後に減少することを示しており[Benezra et al., 1990]、同じMEL細胞とよばれているものでも細胞株の違いによってIdの発現に違いがみられている。本研究で用いた細胞株DS19/3では、Id1の発現が分化誘導前後で大きく変化しており、同時にId1の高発現による分化の阻害が観察されたが、一方で我々は、分化誘導前からId1の発現が少なく、分化誘導後にもId1の発現量にほとんど変化がみられない細胞株B8が存在し、B8株にId1を高発現させても分化阻害がみられないことを観察している(データは示さない)。このようなMEL細胞のなかでのIdの発現の違い、Id高発現への反応の違いは、細胞株の由来に依存するものと思われる。すなわち、MEL細胞は、Friend VirusによってCFU-E周辺の未分化な前赤芽球細胞がトランスフォームした細胞であり、それぞれに樹立された細胞株によって、その分化段階にはある程度の広がりがあるのだろう。そして、おそらくは細胞株ごとの分化段階の違いが、発現するIdの種類の違いや、Idを高発現させたときの分化阻害の有無を決めているのであろう。我々は胎生13日目のFetal Liver由来のCFU-EではId1の発現がほとんどないことを観察しているが(データは示さな

い)、これは*Id1*のDown RegulationがCFU-E以前にあることを予想させる。また本研究で、MEL細胞DS19/3株では、分化誘導後12時間を超えてからは、*Id1*の発現を誘導しても分化阻害が起こらないことを示したが(図9)、このことは前赤芽球の分化において、分化段階の早い時期にBasic-HLHタンパクが関与しているため、分化段階の早い、比較的未熟なMEL細胞株のみが*Id*高発現に反応し、分化段階の遅いMEL細胞株は*Id*高発現に反応しない、という我々の考えを支持するように思われる。

MEL細胞分化の分子機構

これまでに*Id*のほかにも、核内癌遺伝子*c-myc*、*c-myb*がMEL細胞分化に阻害的に作用すること、また当教室山本らによってクローニングされた*MER5*のアンチセンスRNAが、MEL細胞の分化を阻害することが遺伝子導入実験により示されている。これまでに得られている断片的な知見——*c-myc*、*c-myb*を高発現させたときに、MEL細胞の分化誘導直後に発現の変動する"Latent Period Gene"の発現パターンが違っていること(ある種のLatent Period Geneについて*c-Myc*のみが分化誘導時の発現パターンを変化させている[Cheng et al., 1989]や、*c-myc*の高発現が*MER5*の遺伝子発現を減少させること、さらに、*c-Myc*のみがMEL細胞分化のコミットメントを阻害することが確かめられていること[Kume et al., 1988][Ohmori et al., in press]——から、*c-Myc*が、*c-Myb*や*MER5*よりも分化プロセスの早い時期に作用すると考えることができる。筆者らは以前に、*c-Myc*の高発現が*Id*の発現パターンを変化させないことを示している[Shoji et al., submitted]が、さらに今回、本研究において、*Id*がMEL細胞分化の初期過程に作用することと、*Id*の高発現が*c-myc*の発現パターンを変化させないことが示された。以上のことを総合すると、*Id*と*c-Myc*はどちらもMEL細胞分化の初期のプロセスに作用しているが、それぞれの遺伝子発現に階層性はなく、おそらく独立した制御を受けていることが予想される。

MEL細胞分化の決定(コミットメント)に重要な役割を果たしている*c-Myc*はBasic-HLH-LR(Basic-HLHのC末側に隣接したLeucine Repeatをもつ)モチーフを持つDNA結合タンパクであるが、そのBasic-HLH部分はMyoD、E12/E47などのBasic-HLHと非常によく似たアミノ酸配列を持っており、*Id*と*c-Myc*が同じタンパクをターゲットとして分化を制御する可能性も考えることができる。しかし、これまでのIn vitro結合実験から*c-Myc*は、MyoD、E12/E47などのBasic-HLHタンパクや、*Id*とは結合せず、*c-Myc*と同じくBasic-HLH-LRモチーフをもつMaxとのみ結合して2量体を形成するとされており、*Id*と*c-Myc*が同じタンパクをターゲットとするというアイデアは否定的である[Miner et al., 1991][Sun et al., 1991]。もしそうだとすれば、*Id*と*c-Myc*は全く別々の2つのプロセスをもってMEL細胞分化の決定(コミットメント)を進めているのだろうか。血球細胞の分化においては、「未分化な細胞の分化方向への決定は確率によって規定される」というStochasticモデルが、多能性幹細胞を用いた詳細な観察から提唱され[Gusella et al., 1976]、広く受け入れられているが、*Id*、*c-Myc*など複数の分化決定因子が存在し、それらが別個のプロセスをもって、さまざまな程度に分化の決定に寄与している、という考えは、このStochasticモデルに合っているように思われる。いずれにしても、今後、*Id*により制御されるBasic-HLHタンパクを同定し、構造、機能を明らかにしていくことによって、この点は明らかになっていくであろう。そうすることによって赤芽球分化の分子機構の解明に大きく貢献できるものと思われる。

材料と方法

一般的な手法

ここで特に取り上げなかったもの、もしくは簡単にしかふれていないものについては文献[Sambrook et al., 1989]に従って行なった。

導入遺伝子の作成

マウスId遺伝子のcDNAはFred Hutchinson癌研究センターのHarold Weintraub教授より供与していただいた。このcDNAよりコーディング領域を完全に含むSmaI-DraI断片約0.8Kbpを平滑末端にしたのち、発現ベクターに挿入した。発現ベクターはKumeらによって作成されたpSVneoHMT[Kume et al., 1988]のメタロチオネインプロモーター部分(3'側リンカー部に開始コドンを含んでいた)を3'末側よりExonucleaseIIIとMung Bean Nucleaseを用いて約30 bp欠失させ、さらに挿入遺伝子の下流にSV40のTerminatorを配置できるように改良したpSVneoHMTdelTerを用いた。この結果、IdcDNAはヒトメタロチオネインプロモーターの制御化におかれ、Zn²⁺などの重金属により発現の誘導されることが期待された。

MEL細胞(DS19/3株)の培養および遺伝子導入

MEL細胞はEagles MEM培地(日水製薬)、10%牛胎仔血清を用い、37℃、5%CO₂下で培養した。前項で作成したプラスミドはプロトプラスト融合法でMEL細胞(DS19/3株)に導入した[帯刀, 1990]。これらのプラスミドで形質転換した大腸菌 HB101をL-broth培地で培養し、OD₆₅₀=0.7~0.9の時にクロラムフェニコール(100μg/ml)をくわえて18時間培養した。集菌後、50mM Tris・HCl pH8.0 40mlで2回洗浄し、20% ショ糖/50mM Tris・HCl pH8.0 10mlに懸濁した。これに10mg/ml リゾチーム/50mM Tris・HCl pH8.0 を2ml加え10分間処理後、0.25M EDTA・3Na 5ml、9% ショ糖/50mM Tris・HCl pH8.0 130ml、1 M MgCl₂ 3mlに懸濁し、プロトプラストを形成した。

MEL細胞はあらかじめポリ-L-リジンでコーティングしたφ35mmマルチディッシュプレートにまき接着させておき(4×10⁵ cells/dish)、培地除去後、プロトプラストを2ml加え、260×gで3分間プレートごと遠心したペレットに48%(w/w)ポリエチレングリコール1000/MEM培地(血清なし)で4回洗浄し、12.5μg/ml テトラサイクリン含有MEM培地(10%血清)を加えて融合を完了した。

一日後、100μg/ml G418で選択を開始したところ約2週間でG418耐性形質転換株がコロニーとして出現してきた。このコロニーを単離することにより、単クローン化した形質転換株を作成した。

形質転換株の分化誘導と導入遺伝子の発現誘導

各形質転換株および親株DS19/3は、1.8%DMSO含有培地で培養することにより分化を誘導した。このときZnCl₂添加群と非添加群を用意し、添加群には最終濃度160~200 μMになるようにZnCl₂を添加し、導入遺伝子を発現させた。

分化の程度は細胞を一部としてベンチジン染色し、分化してヘモグロビンを産生している細胞を染め、染まった細胞の全細胞に対する割合を分化誘導率とした。ベンチジン染色は細胞浮遊液とベンチジン液(0.5% ベンチジン/15% 酢酸)と30% 過酸化水素水を25:5:1の割合で混合することで行なった。

RNAの抽出

リン酸バッファーにて洗浄した細胞に対し、1×10⁸あたり1mlのグアニジンチオシアン酸バッファーを加え細胞を破碎後、5.7M CsClクッション液に重層し、20℃にて150000×g 16時間超遠心した。この沈殿をdDDWに溶解させ、フェノール、クロロホルムで抽出、ついでエタノール沈殿し、再度stDDWに溶解してtotal RNA標品とした。

ノーザンブロッティング

RNA30μgを2%ホルムアルデヒド/1.5%アガロースゲルで電気泳動し、ナイロンメンブレン(Paul社 BYODYNE B)にトランスファーした。80℃で2時間バークした後、プレハイブリダイゼーション溶液(50% ホルムアミド, 5×SSC, 5×FBP, 50mM Na₂HPO₃ pH6.5,

1%グリシン, 500 μ g/ml 変性サケ精子DNA, 0.2%SDS) 中で42℃にて2時間、インキュベートした。次いで、 32 PでラベルしたDNAプローブ $1 \times 10^5 \sim 10^6$ cpm/mlを含むハイブリダイゼーション溶液 (50% ホルムアミド, 5 \times SSC, 5 \times FBP, 20mM Na₂HPO₄ pH6.5, 10% デキストラン硫酸塩, 500 μ g/ml 変性サケ精子DNA, 0.2%SDS) 中で42℃、16時間ハイブリダイズした。洗浄は最終濃度0.1% SSC, 0.1%SDS溶液で、60℃、30分行ない、オートラジオグラフィーを行なった。シグナルの定量はFUJI社のパイオイメージアナライザーBAS2000で行なった。

核抽出液の調製

全ての操作は4℃で行なった。1 \sim 2 $\times 10^9$ 個のMEL細胞をリン酸バッファーで2回洗浄後、細胞容積の約4倍量の低張バッファー (10mM HEPES pH7.9, 1.5mM MgCl, 10mM KCl, 0.5mM DTT, 0.5mM PMSF) に懸濁し、10分放置後 1500g, 15分間遠心した。この沈殿に再度低張バッファーを加え、Dounce Homogenizer (B pestle)で30ストロークホモジェナイズし、800g, 10分遠心して上清を捨て、さらに25000g, 20分遠心した。この沈殿に、沈殿と等量の 20mM HEPES pH7.9, 25% Glycerol, 0.42M NaCl, 1.5mM MgCl, 0.2mM EDTA \cdot 3Na, 0.5mM DTT, 0.5mM PMSF溶液を加え、Dounce Homogenizer (B pestle)で10ストロークホモジェナイズし、30分攪拌した後、25000g, 30分間遠心した。この上清を 20mM HEPES, 20% Glycerol, 0.1M KCl, 0.2mM EDTA \cdot 3Na, 0.5mM DTT, 0.5mM PMSF溶液中で4時間透析し、25000g, 30分遠心した上清を -80°C で凍結保存して核抽出液として利用した。

オリゴDNAの合成と精製

GST- Δ Id融合タンパク作成のためにId cDNAに変異を導入するようにデザインしたオリゴDNAと、ゲルシフトアッセイのプローブに使用したオリゴDNAは、ホスホアミダイドを用いた固相合成法により合成した。合成されたDNAは濃アンモニア水中、65℃、一時間処理することにより担体から回収した。この粗オリゴDNAを以下のように精製した。まず減圧化で乾燥後、その残渣をFA dye (98% ホルムアミド, 0.1% BPB, 0.1% キシレンシアノール) に溶解させ、このうち半量を7M Urea-10% ポリアクリルアミド電気泳動にかけた。BPBがゲルの下端に来たところで泳動を停止し、ゲルを1 μ g/mlの臭化エチジウムを含む蒸留水中で5分間おだやかに振盪させた後、UVトランスイルミネーター(366nm)上で完全長のオリゴDNAに相当するバンドを検出した。これを切り出し、細かくつぶした後、PAGE elution buffer (500mM 酢酸アンモニウム, 1mM EDTA, 0.1%SDS) 1mlに懸濁し、37℃で24時間振盪させた。遠心後、上清を回収し、等量のフェノールおよびクロロフォルムでそれぞれ抽出し、エタノール沈殿を行なって、stDDWに溶かし、合成オリゴ標品とした。

ゲルシフトアッセイ

DNAプローブには、MyoDをはじめとするBasic-HLH転写因子の認識配列をコアにもつ筋クレアチンキナーゼ (MCK) エンハンサー25bpsのオリゴDNAを用いた。その塩基配列は、

GATCCCCCAACACCTGCTGCCTGA

GGGGGTTGTGGACGACGGACTCTAG

である。

このオリゴDNAのUpper strandを $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ とT4 Polynucleotide Kinaseを用いたリン酸化反応によってラベルし、Sephadex G50 spin columnで未反応のラベルを除去した後、100倍のモル比の反対鎖DNAとアニールさせ、アッセイに用いた。

このプローブ0.1ngに核抽出液0.6 μ g、Poly(dIdC)²1 μ gを加え、DNA binding cocktail (最終濃度:20mM HEPES pH7.6, 50mM KCl, 1mM DTT, 1mM EDTA, 5% Glycerol) 10 μ l中で30℃、15分反応させた後、5%ポリアクリルアミドゲル/1 \times TBEバッファーで120V、3時間泳動し、乾燥後、オートラジオグラフィーを行なった。

大腸菌による融合タンパクの生産と精製

T7RNAポリメラーゼを用いた方法をつかって行なった。融合タンパクの可溶性を得るために、Idの第78、79番アミノ酸にまたがる部分に制限酵素BamHIサイトを作るような変異体を作成し、このサイトよりC末側のタンパク（HLH部分(第87～127番アミノ酸)を完全に含む）とGSTとの融合タンパクをデザインした。具体的には変異体遺伝子をBamHIで切断し、C末側になるような0.8kbp断片をpETGSTのBamHIサイトに挿入した。このプラスミドを大腸菌株BL21 (LydS) に導入し、得られた新鮮なコロニーを50mlのプラスチックチューブに入った5mlのZYM9培地に移し、37℃で6～9時間激しく振盪した。この菌液がわずかに濁ったところ（OD₅₉₅～0.1）で1mlの50% Glycerolを加えて良く攪拌した後、分注して-80℃で保存した（Glycerol Stock）。このGlycerol Stock 200μlを500mlのZYM9培地に移し、室温で激しく振盪した。OD₅₉₅が0.7～1のあいだにIPTGを終濃度0.4mMになるように加えた後、さらに30℃で3時間保温した。以下の操作はすべて4℃で行なった。菌液を氷上で30分放置して冷却後、2000gで5分間遠心して菌体を回収した。これを Extraction Buffer（50mM Tris・HCl pH8.0, 20mM EDTA, 0.07% β-Mercaptoethanol, 0.2mM PMSF）10 mlによく懸濁してBranson Sonifierを用いてマイクロチップのレベル2で30秒ずつ15回超音波処理を行なった。溶液のOD₅₉₅がもとの10%以下になっていることを確認後、10000gで10分遠心し、上清に終濃度1%になるようにTriton X-100を加えた。これをグルタチオンセファロースをつめたカラムにゆっくりと流し、Extraction Bufferで十分に洗浄後、5mlのElution Buffer（0.1M Glycine-NaOH pH9.6, 0.1M NaCl, 5mM Glutathione, 10% Glycerol）で分画をとりながら抽出し、ただちに各サンプルに1/10量の1M TrisHCl pH6.8を加えた。これらをSDS-PAGEで電気泳動し、目的の融合タンパクの多く含まれる分画を集めて-80℃で保存し、精製標品とした。

ウェストウェスタンブロッティング

核抽出液0.5mgを10% SDS-PAGEで電気泳動、ニトロセルロースメンブレンにトランスファーした後、メンブレンを、6M グアニジン塩酸塩/HBB(20mM HEPES, 5mM MgCl₂, 1mM KCl, 5mM DTT)、3M グアニジン塩酸塩/HBB(20mM HEPES, 5mM MgCl₂, 1mM KCl, 5mM DTT)、HBB(20mM HEPES, 5mM MgCl₂, 1mM KCl, 5mM DTT)の順に処理し、タンパクのDenature/Renatureを行なった。5% Skim Milk/PBSでブロッキングした後、スロットブロッターを用いて1 μg/ml GST, 0.3 μg/ml GST-myc(wb), 0.1～3 μg/ml GST-ΔIdを含む1% Skim Milk/PBS溶液のタンパク結合反応を、室温、12時間行なった。このメンブレンを、1000倍希釈抗GST抗血清により5% Skim Milk, 0.2% Triton X-100/PBS pH7.4溶液中で一次抗体反応を1時間、さらに1000倍希釈のペルオキシダーゼ結合抗ウサギIgG抗血清(Zymed社)により二次抗体反応を1時間行ない、ルミノール反応を利用したEnhanced Chemiluminescence System(Amersham社)によりオートラジオグラフィフィルムに露光を行なった。

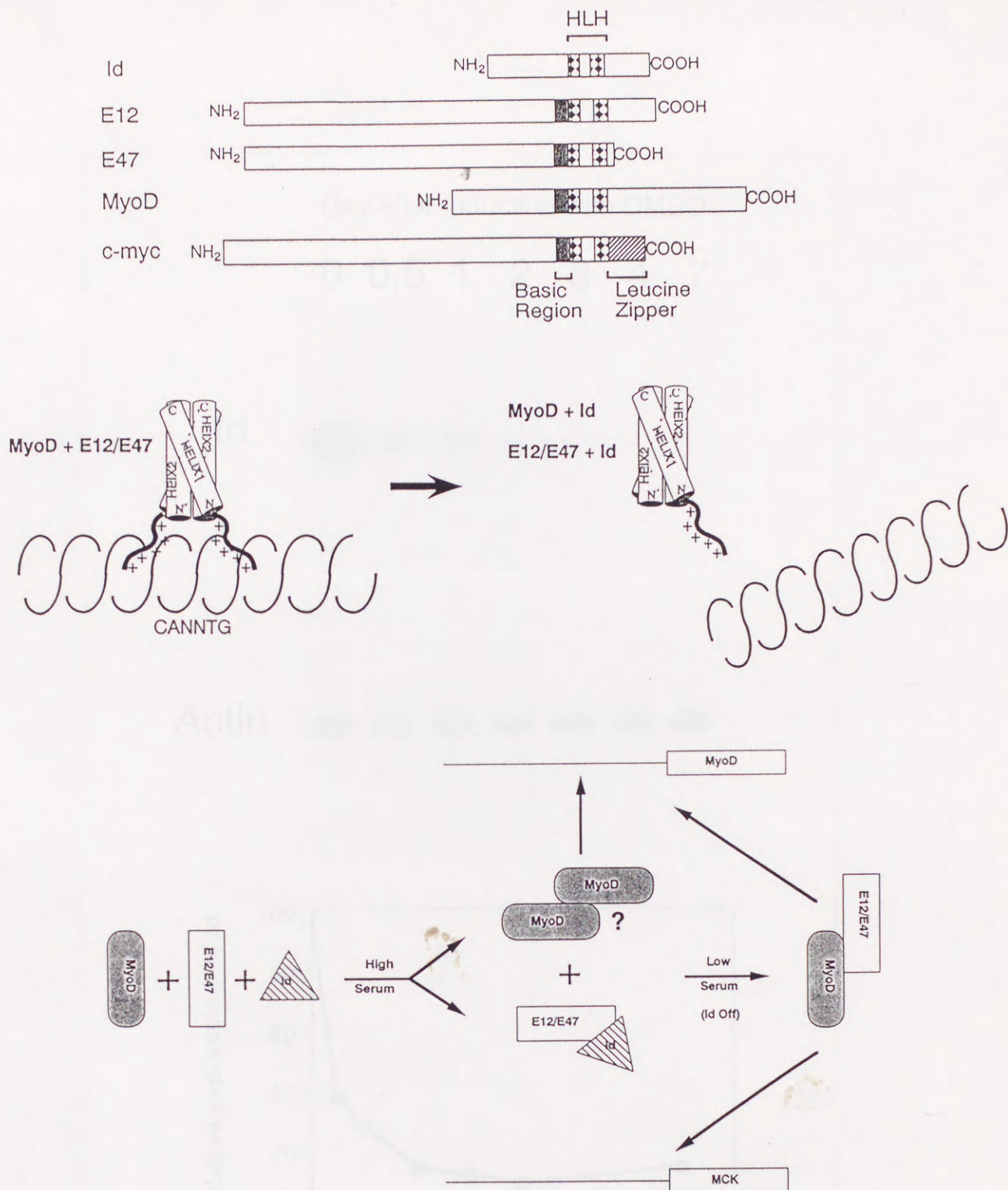


図 1

(A) 代表的なHLHタンパクの構造

(B) 予想されるHLHタンパクの分子構造[Cahill et al., 1992]

Basic-HLHタンパクどうしのhomodimer、heterodimerは塩基配列特異的にDNAに結合するが、IdとBasic-HLHタンパクのheterodimerはDNA結合能を失ってしまう。

(C) タンパク-タンパク相互作用を介したMyoDの制御[Benezra et al., 1990]

胎児性線維芽細胞10T1/2に由来するP2 aza-myoblastsは血清濃度を下げることにより分化が誘導され、最終的に筋管細胞を形成するようになる。これは分化前にIdと結合していたE12/E47が、分化誘導後のIdの減少によってMyoDとのHeterodimerを作るようになり、これがE boxに結合して筋特異的遺伝子の発現を活性化したためと考えることができる。

(IdとE12/E47の結合は、MyoDとE12/E47の結合の5倍強力である。[Benezra et al., 1990])

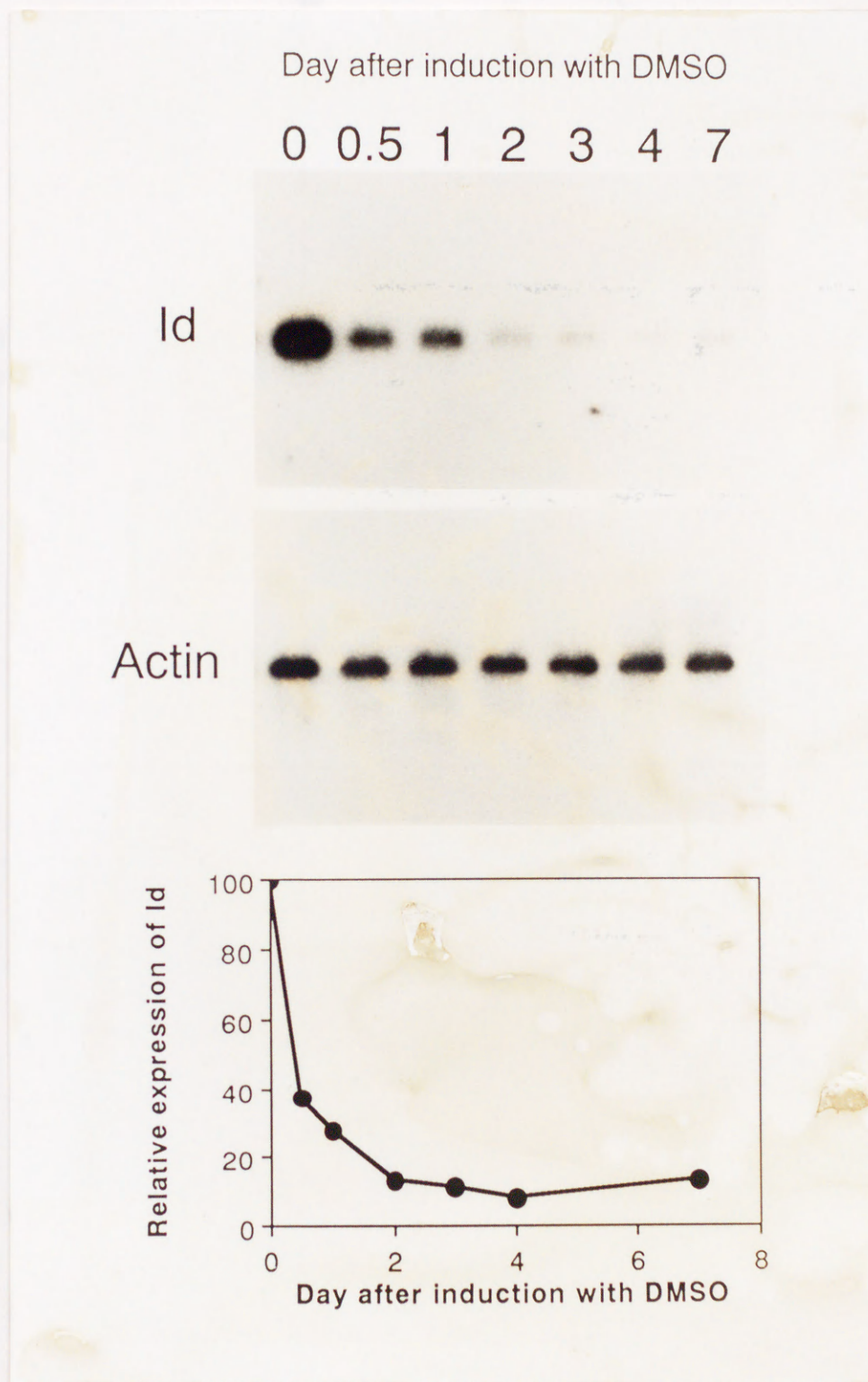


図 2

MEL細胞分化誘導時のIdの発現パターン

Idの発現は分化誘導後速やかに減少をはじめ、1日後には分化誘導前の1/10になる。

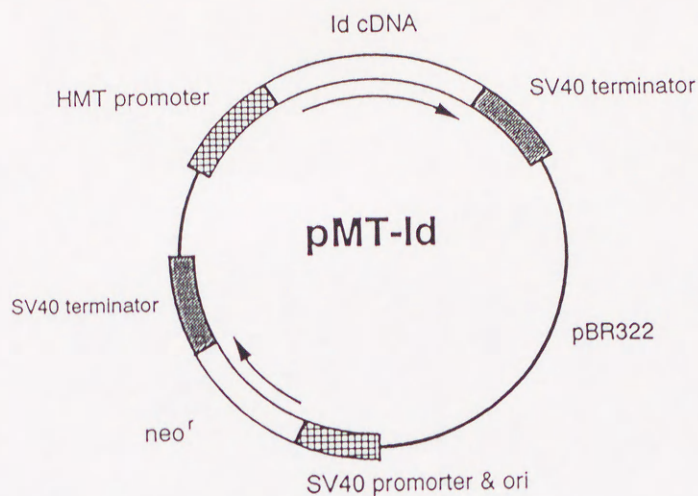


図 3

MEL細胞に導入したプラスミドの構造

マウス *Id* cDNA を pSVneoHMTdel (本研究論文「材料と方法」参照) のヒトメタロチオネイン II_A (HMT) プロモーターの下流に挿入した。

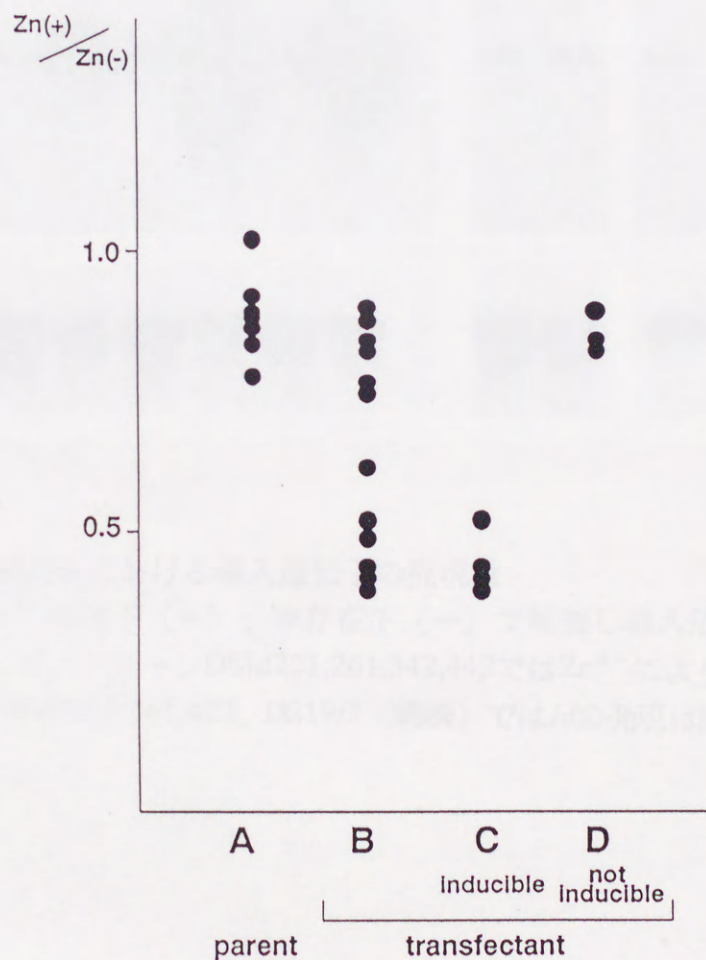


図 4

Id の MEL 細胞分化への影響

一つ一つの点が、一つ一つの形質転換株に相当する。どのクローンも duplicate で実験を行ない、その平均を図に示した。縦軸は (Zn^{2+} 添加時の分化率) / (Zn^{2+} 非添加時の分化率)、横軸は A: 親株 DS19/3 を改めてクローニングしたもの、B: 無作為に選択した *Id* 導入株 12 クローン、C: Zn^{2+} による *Id* の誘導がノザンブロットで確認できたクローン、D: Zn^{2+} により *Id* が誘導されないことをノザンブロットで確認できたクローンである。*Id* が誘導可能な形で導入されたクローンのみが Zn^{2+} に依存して MEL 細胞の分化を阻害することが認められた。

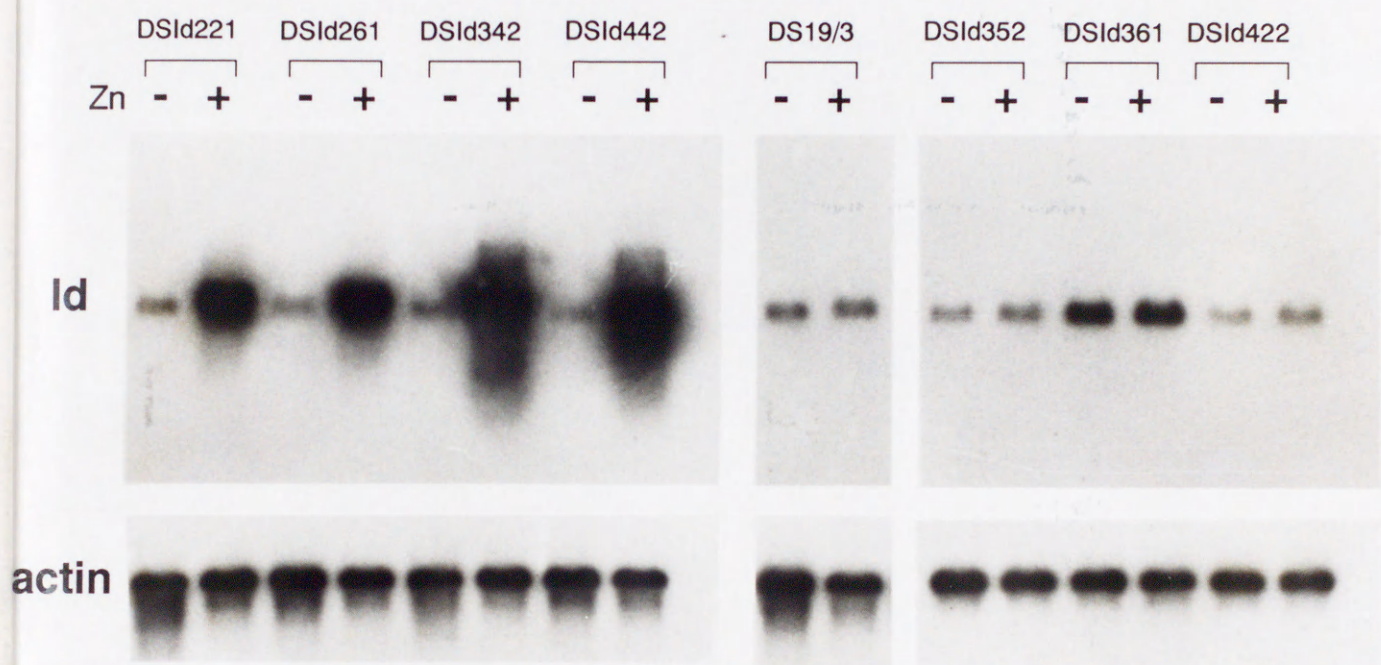


図 5

(A) Id導入細胞株における導入遺伝子の発現量

各細胞株を Zn^{2+} 存在下 (+)、非存在下 (-) で培養し導入遺伝子の発現をノザンブロットで確認した。クローンDSId221,261,342,442では Zn^{2+} によりIdの発現が10~20倍に誘導されたが、DSId352,361,422、DS19/3 (親株) ではIdの発現は変化が見られなかった。

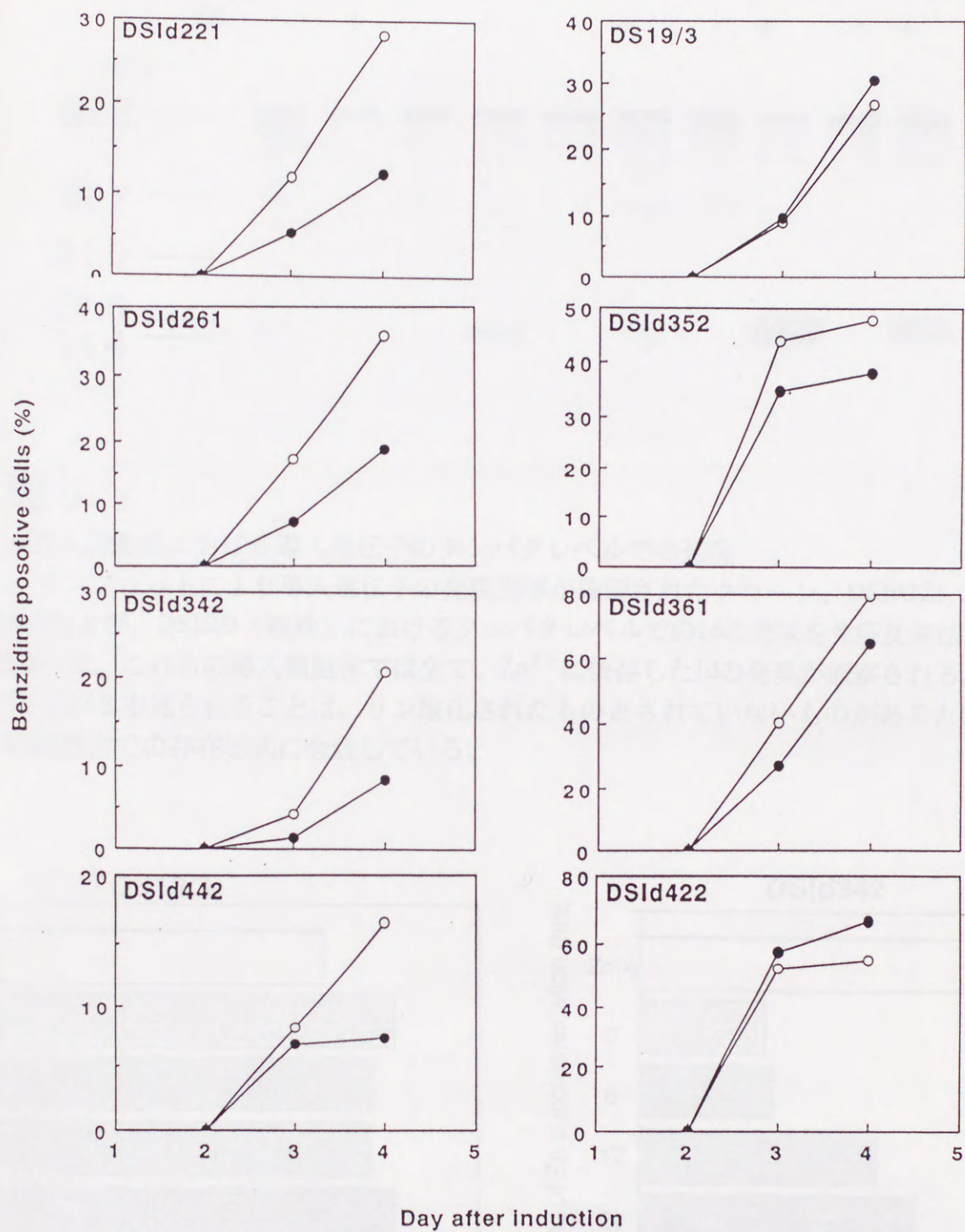


図 5

(B) Id導入細胞株における分化阻害効果

各細胞株をZn²⁺存在下(●)、非存在下(○)で分化誘導し、2~4日目の分化誘導率を経時的に示した。左の列は(A)でZn²⁺によるIdの誘導が観察されたクローン、右の列は誘導が観察されなかったクローンと親株である。Idの誘導が観察された左の列でのみ、著しい分化の阻害が観察される。

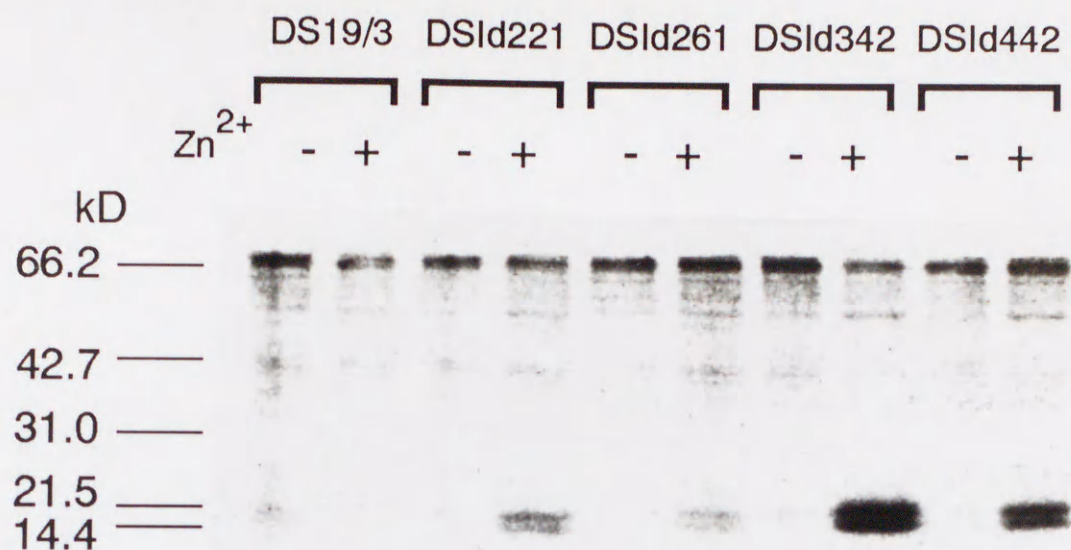


図 6

Id導入細胞株における導入遺伝子のタンパクレベルでの発現

ノザンブロットにより導入遺伝子の発現誘導が確認されたクローン、DSId221, 261, 342, 442および、DS19/3（親株）におけるタンパクレベルでのIdの発現を免疫沈降法により確認した。これらの導入細胞株では全て、Zn²⁺に依存したIdの発現が観察される。なおバンドが2本見られることは、リン酸化されたものとされていないものがあるという、Idの細胞内での存在様式に合致している。

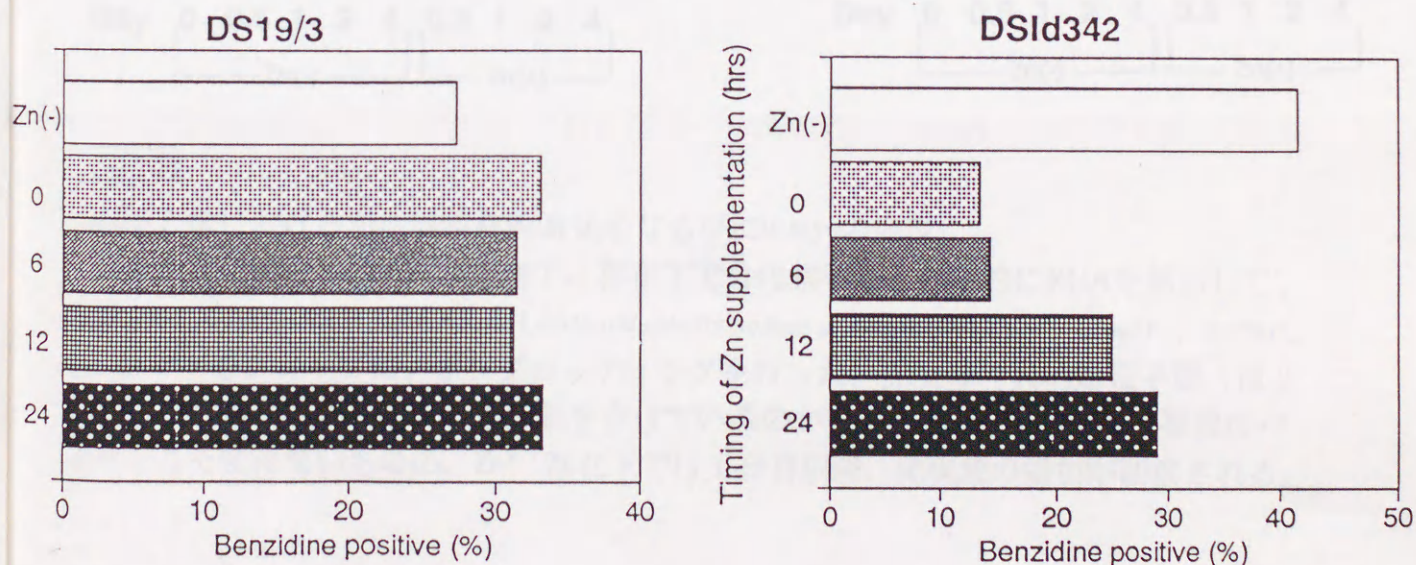


図 7

分化誘導後、異なったタイミングでIdを誘導したときの分化阻害効果

Id導入株を分化誘導後、異なったタイミングで培地中にZn²⁺を添加し、Idの発現時期と分化阻害効果の関係を観察した。その結果、Id導入株DSId342では分化誘導直後、もしくは分化誘導後6時間以内にZn²⁺を加えた場合に最も大きな阻害効果が得られ、12時間、24時間と、Zn²⁺の添加時期を遅らせていくと分化阻害の効果が小さくなった。

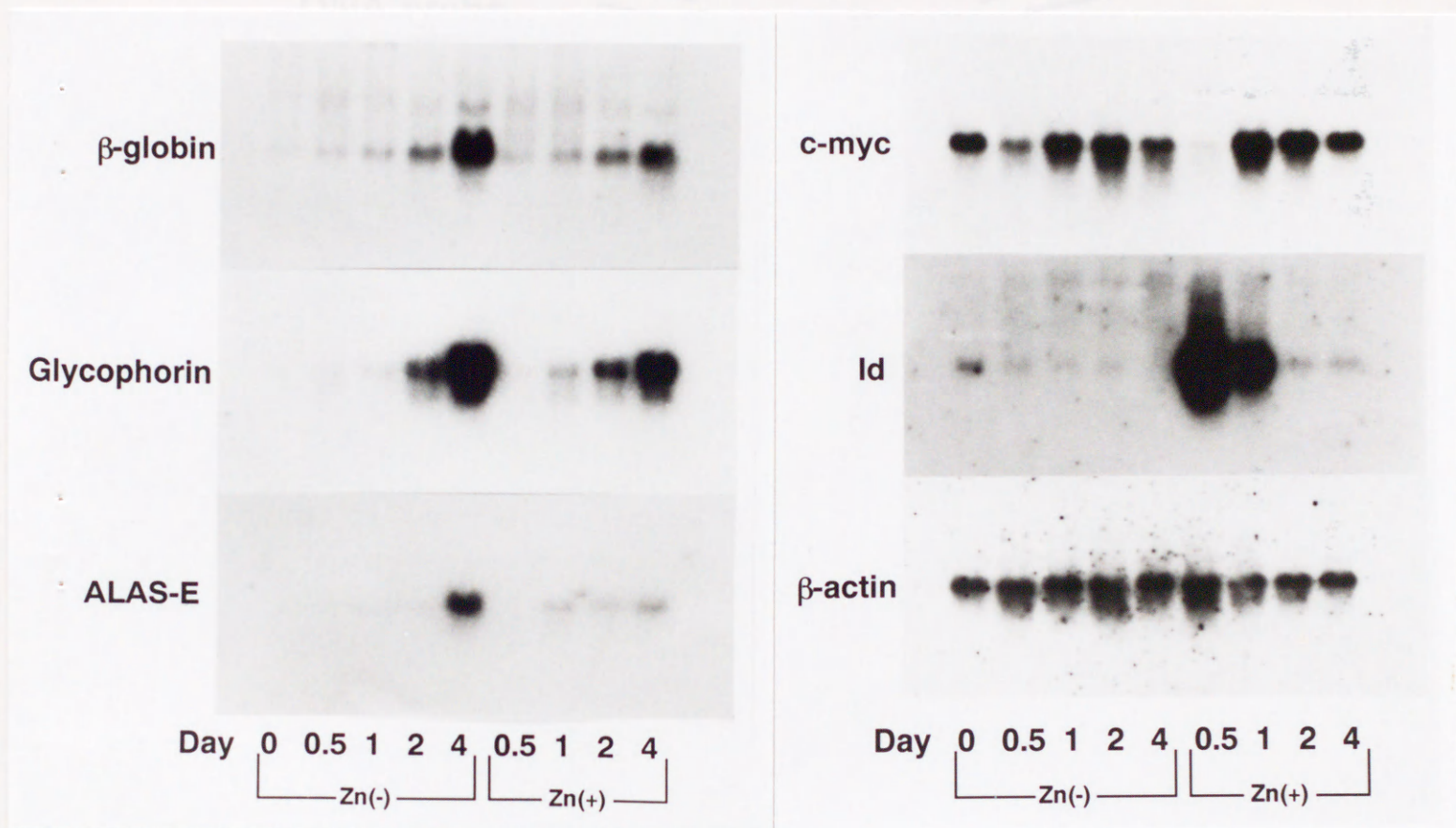


図 8

*Id*導入株における赤血球特異的遺伝子ならびに*c-myc*の発現

*Id*導入株DSId342を Zn^{2+} 非存在下、存在下で分化誘導し、経時的にRNAを抽出して、 β -globin、Glycophorin、ALAS-E (Erythroid specific isoform of δ -aminolevulinate synthase)、*c-myc*、*Id*、 β -actinをプローブにノザンブロッティングを行った。赤血球特異的遺伝子群（前3者）の発現は*Id*によりいずれも抑制をうけているのが観察される。*c-myc*は、発現のパターンこそ変化ないものの、 Zn^{2+} 存在下では1日目以降、発現量の増加が観察される。

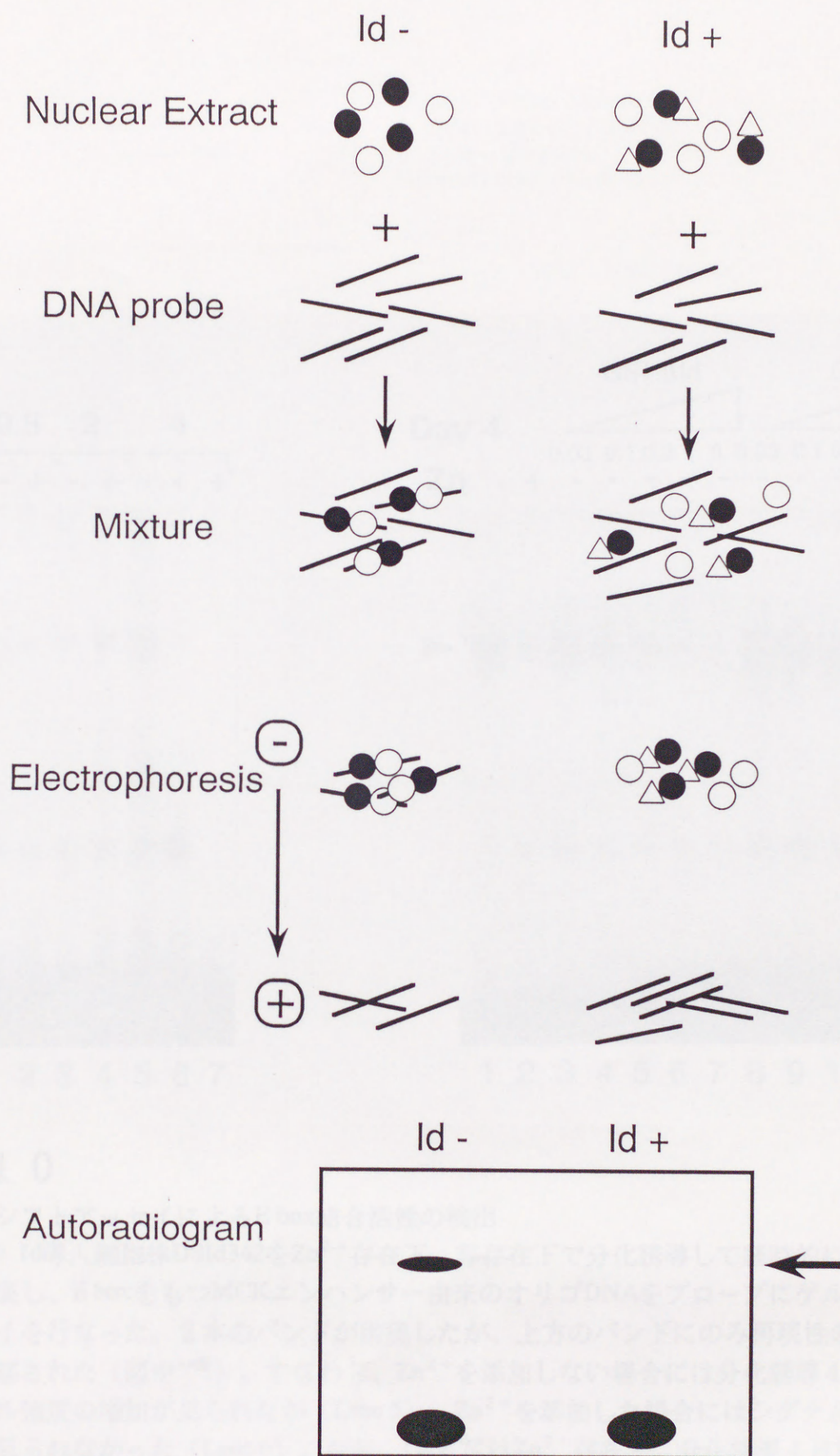


図 9

ゲルシフトアッセイの概略

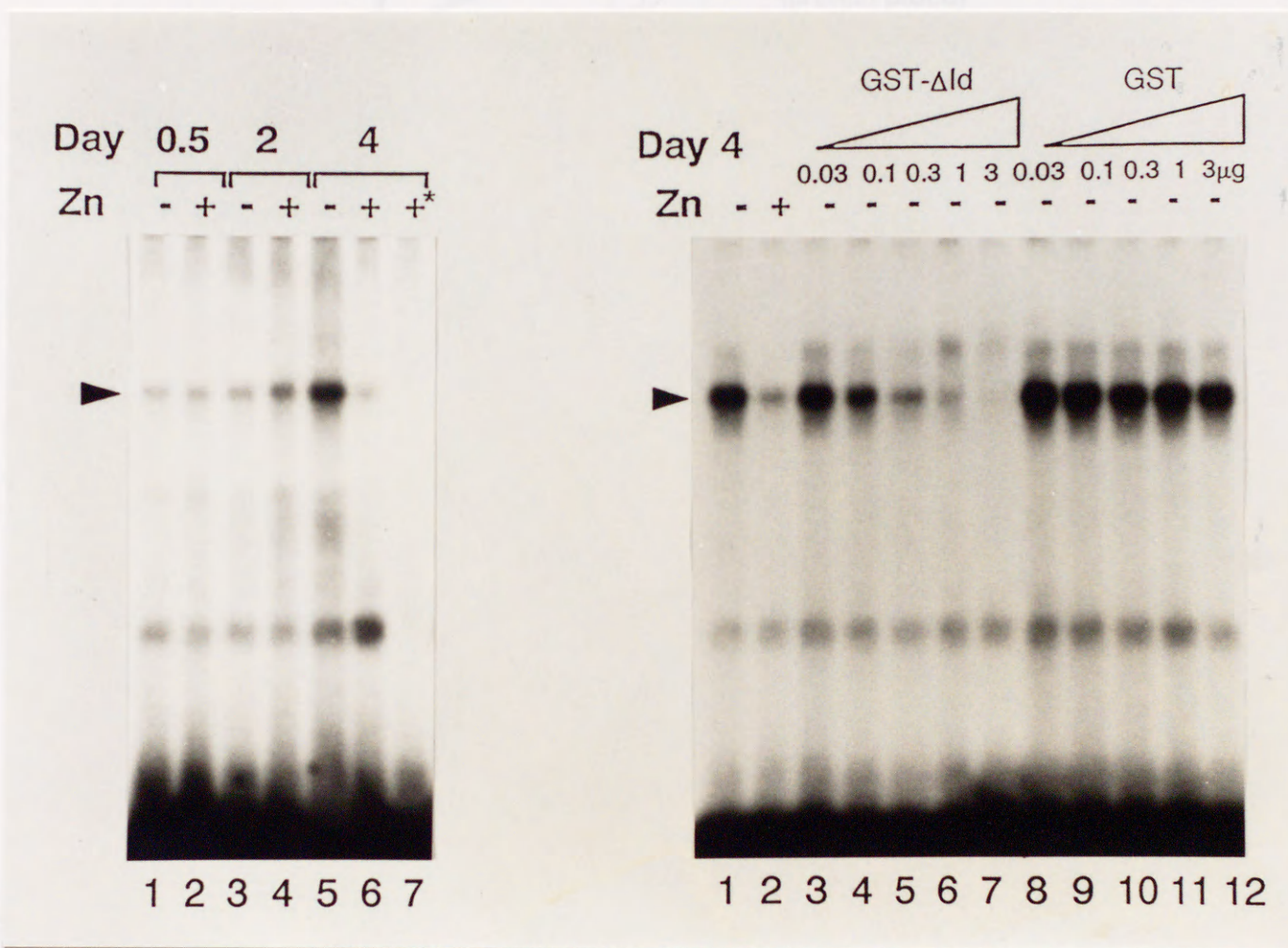


図 10

ゲルシフトアッセイによるE box結合活性の検出

(左) Id導入細胞株DSId342をZn²⁺存在下、非存在下で分化誘導して経時的に核抽出液を調製し、E boxをもつMCKエンハンサー由来のオリゴDNAをプローブにゲルシフトアッセイを行なった。2本のバンドが出現したが、上方のバンドにのみ再現性のある変化が観察された(図中◀)。すなわち、Zn²⁺を添加しない場合には分化誘導4日目にシグナル強度の増加が見られたが(Lane 5)、Zn²⁺を添加した場合にはシグナル強度の増加が見られなかった(Lane 6)。なお、Lane 7*はZn²⁺存在下、分化誘導4日目の反応溶液にプローブの500倍のCold Competetorを加えたものである。

(右) E box結合活性の増加したZn²⁺(-)、分化誘導4日目の核抽出液に大腸菌で産生したGST-ΔId、ならびにGSTを添加したところ、上方のバンド(図中◀)において、GST-ΔIdの添加量に依存したシグナル強度の減少が観察された。このことは、このバンドのシグナル強度が核抽出液中のE box結合活性を反映することを示している。

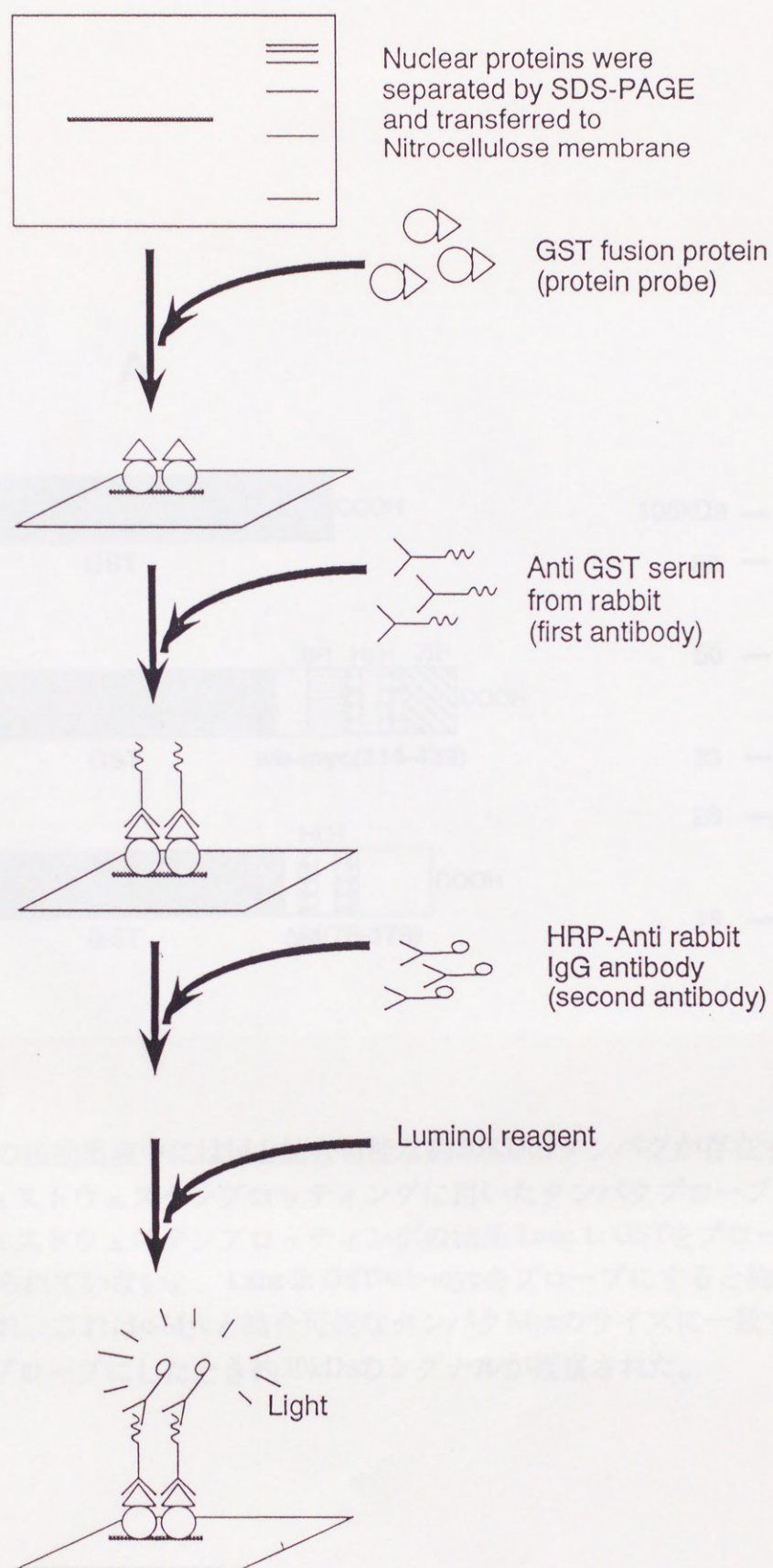


図 1 1

ウェストウェスタンブロッティングの概略

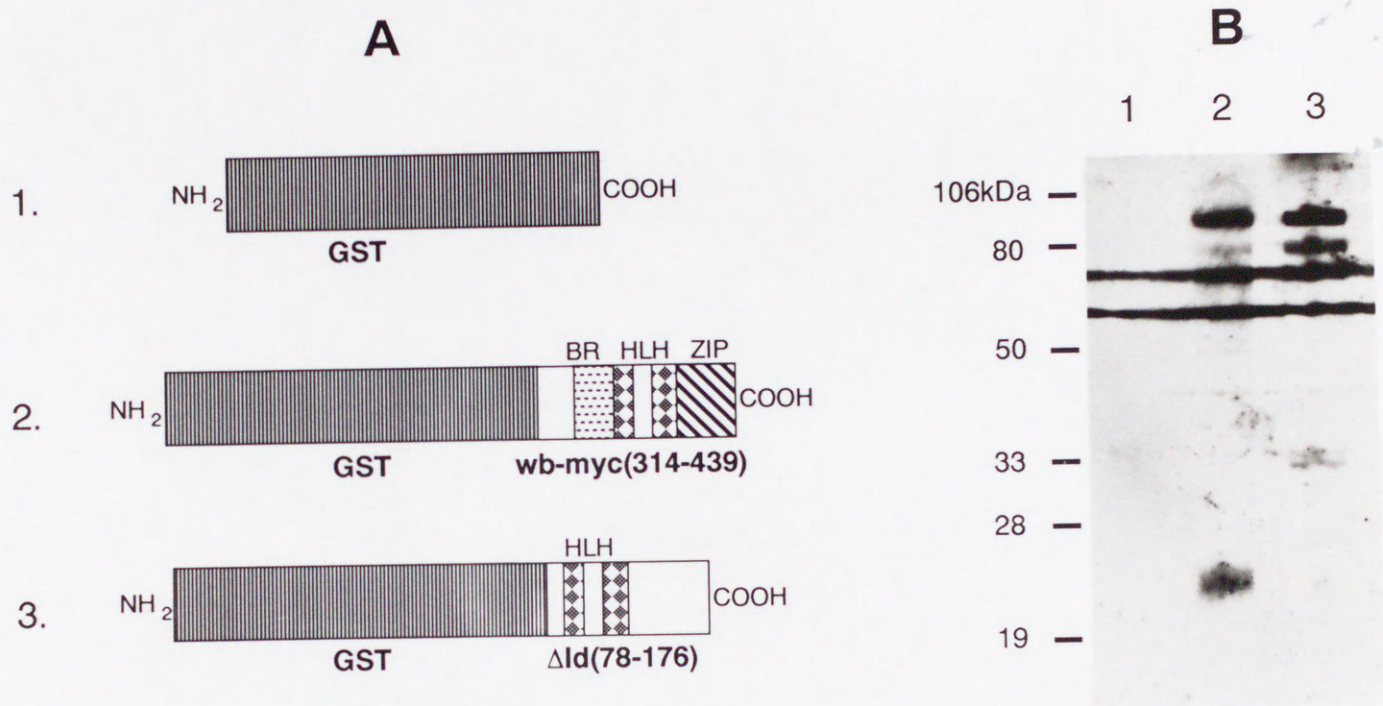


図 1 2

MEL細胞の核抽出液中にはIdと結合可能な約30KDのタンパクが存在する

(A) ウェストウェスタンブロッティングに用いたタンパクプローブ

(B) ウェストウェスタンブロッティングの結果 Lane 1: GSTをプローブにした場合シグナルは得られていない。 Lane 2: GST-wb-mycをプローブにすると約20kDaのシグナルが観察され、これはc-Mycと結合可能なタンパクMaxのサイズに一致する。 Lane 3: GST-ΔIdをプローブにしたとき約30kDaのシグナルが観察された。

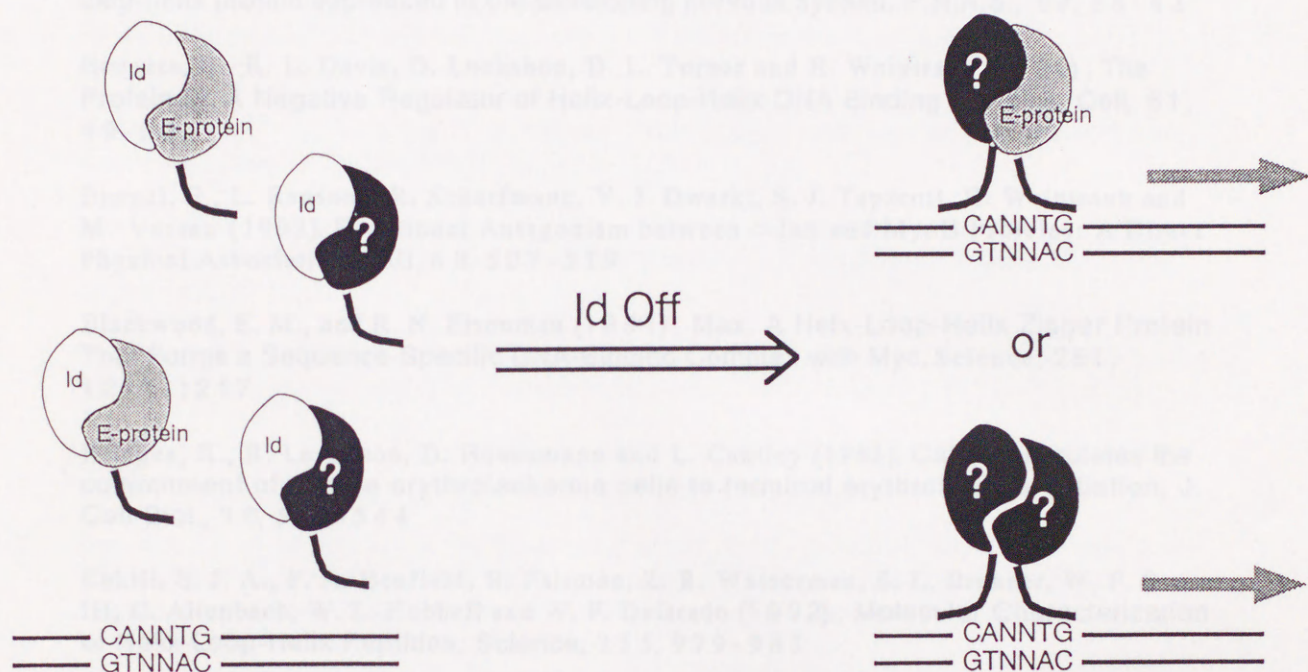


図 1 3

本研究により考察された、IdによるMEL細胞分化制御のモデル

MEL細胞は培地中にDMSOを添加することにより赤血球方向へ分化するが、これは分化前にIdにより不活性化状態にあった未知のBasic-HLHタンパクが、分化刺激後のIdの減少により活性化状態となり、分化を進行させるような遺伝子もしくは分化特異的遺伝子の発現を引き起こしたためと考えることができる。

References

- Begley, C. G., P. D. Aplan, S. M. Denning, B. F. Haynes, T. A. Waldmann and I. R. Kirsch (1989). The gene SCL is expressed during early hematopoiesis and encodes a differentiation-related DNA-binding motif. *P. N. A. S.*, 86, 10128-10132
- Begley, C. G., J. Visvader, A. R. Green, P. D. Aplan, D. Metcalf, I. R. Kirsch and N. M. Gough (1991). Molecular cloning and chromosomal localization of the murine homolog of the human helix-loop-helix gene SCL. *P. N. A. S.*, 88, 869-873
- Begley, C. G., S. Lipkowitz, V. Göbel, K. A. Mahon, V. Bertness, A. R. Green, N. M. Gough and I. R. Kirsch (1992). Molecular characterization of NSCL, a gene encoding a helix-loop-helix protein expressed in the developing nervous system. *P.N.A.S.*, 89, 38-42
- Benezra, R., R. L. Davis, D. Lockshon, D. L. Turner and H. Weintraub (1990). The Protein Id: A Negative Regulator of Helix-Loop-Helix DNA Binding Proteins. *Cell*, 61, 49-59
- Bengal, E., L. Ransone, R. Scharfmann, V. J. Dwarki, S. J. Tapscott, H. Weintraub and M. Verma (1992). Functional Antagonism between c-Jun and MyoD Proteins: A Direct Physical Association. *Cell*, 68, 507-519
- Blackwood, E. M., and R. N. Eisenman (1991). Max: A Helix-Loop-Helix Zipper Protein That Forms a Sequence-Specific DNA-Binding Complex with Myc. *Science*, 251, 1211-1217
- Bridges, K., R. Levenson, D. Housemann and L. Cantley (1981). Calcium regulates the commitment of murine erythroleukemia cells to terminal erythroid differentiation. *J. Cell Biol.*, 90, 542-544
- Cahill, S. J. A., P. A. Benfield, R. Fairman, Z. R. Wasserman, S. L. Brenner, W. F. S. III, C. Altenbach, W. L. Hubbell and W. F. DeGrado (1992). Molecular Characterization of Helix-Loop-Helix Peptides. *Science*, 255, 979-983
- Caudy, M., H. Vässin, M. Brand, R. Tuma, L. Y. Jan and Y. N. Jan (1988). daughterless, a Drosophila Gene Essential for Both Neurogenesis and Sex Determination, Has Sequence Similarities to myc and achaete-scute Complex. *Cell*, 55, 1061-1067
- Cheng, G. and A. I. Skoultschi (1989). Rapid Induction of Polyadenylated H1 Histone mRNAs in Mouse Erythroleukemia Cell Is Regulated by c-myc. *M. C. B.*, 9, 2332-2340
- Christy, B. A., L. K. Sanders, L. F. Lau, N. G. Copeland, N. A. Jenkins and D. Nathans (1991). An Id-related helix-loop-helix protein encoded by a growth factor-inducible gene. *P.N.A.S.*, 88, 1815-1819
- Davis, R. L., H. Weintraub and A. B. Lassar (1987). Expression of single gene transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, 51, 987-1000
- Ellis, H. M., D. R. Spann and J. W. Posakony (1990). Extramacrochaetae, a Negative Regulator of Sensory Organ Development in Drosophila, Defines a New Class of Helix-Loop-Helix Proteins. *Cell*, 61, 27-38
- Faletto, D. L. and I. G. Macara (1985). The role of Ca²⁺ in dimethylsulfoxide-induced differentiation of Friend erythroleukemia cells. *J. Biol. Chem.*, 260, 4884-4889

- Faletto, D. L., A. S. Arrow and I. G. Macara (1985). An early decrease in phosphatidylinositol turnover occurs on induction of Friend cell differentiation and preceeds the decrease in c-myc expression. *Cell*, 43, 315-325
- Friend, C., W. Scher, J. G. Holland and T. Sato (1970). Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells in vitro: Stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. *P. N. A. S.*, 68, 378-382
- Garrel J. and J. Modolell (1990). The *Drosophila* extramacrochaetae Locus, an Antagonist of Proneural Genes That, Like These Genes, Encodes a Helix-Loop-Helix Protein. *Cell*, 61, 39-48
- Green, A. R., E. DeLuca and C. G. Begley (1991). Antisense SCL suppresses self-renewal and enhances spontaneous erythroid differentiation of the human leukaemic cell line K562. *EMBO*, 10, 4153-4158
- Green, A. R., E. Salvaris and C. G. Begley (1991). Erythroid expression of the 'helix-loop-helix' gene, SCL. *Oncogene*, 6, 475-479
- Hensold J. O. and D. E. Houseman (1988). Decreased Expression of the Stress Protein HSP70 Is an Early Event in Murine Erythroleukemic Cell Differentiation. *M.C.B.*, 8, 2219-2223
- Henthorn, P., M. Kiledjian and T. Kadesch (1990). Two Distinct Transcription Factors That Bind the immunoglobulin Enhancer μ E5 μ E2 Motif. *Science*, 247, 467-470
- Herskowitz I. (1989). A regulatory hierarchy for cell specialization in yeast. *Nature*, 342, 749-757
- Hu, J.-S., E. N. Olson and R. E. Kingston (1992). HEB, a Helix-Loop-Helix Protein Related to E2A and ITF2 That Can Modulate the DNA-Binding Ability of Myogenic Regulatory Factors. *M.C.B.*, 12, 1031-1042
- Jen, Y., H. Weintraub and R. Benezra (1992). Overexpression of Id protein inhibits the muscle differentiation program: in vivo association of Id with E2A. *Genes & Development*, 6, 1466-1479
- Jhonson, J. E., K. Zimmerman, T. Saito and D. J. Anderson (1992). Induction and repression of mammalian achaete-scute homologue(MASH) gene expression during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Development*, 114, 75-87
- Kreider, B. L., R. Benezra, G. Rovera and T. Kadesch (1992). Inhibition of Myeloid Differentiation by the Helix-Loop-Helix Protein Id. *Science*, 255, 1700-1702
- Kume, T. U., S. Takada and M. Obinata (1988). Probability that the Commitment of Murine Erythroleukemia Cell Differentiation is Determined by the c-myc Level. *J. Mol. Biol.*, 202, 779-786
- Lannigan D. A. and P. A. Knauf (1985). Decreased Na⁺ concentration is an early event in murine erythroleukemic cell differentiation. *J. Biol. Chem.*, 260, 7322-7324
- Lassar, A. B., R. L. Davis, W. E. Wright, T. Kadesch, C. Murre, A. Voronova, D. Baltimore and H. Weintraub (1991). Functional Activity of Myogenic HLH Proteins Requires Hetero-Oligomerization with E12/E47-like Proteins In Vivo. *Cell*, 66, 305-315

- Mager D. and A. Bernstein (1978). Early transport changes during erythroid differentiation of Friend leukemic cells. *J. Cell Physiol.*, 9 4, 275-286
- Miner J. H. and B. J. Wold (1991). c-myc Inhibition of MyoD and Myogenin-Initiated Myogenic Differentiation. *M. C. B.*, 1 1, 2842-2851
- Murre, C., P. S. McCaw and D. Baltimore (1989). A New DNA Binding and Dimerization Motif in Immunoglobulin Enhancer Binding, daughterless, MyoD, and myc Proteins. *Cell*, 56, 777-783
- Murre, C., P. S. McCaw, H. Vaessin, M. Caudy, L. Y. Jan, Y. N. Jan, C. V. Cabrera, J. N. Buskin, S. D. Hauschka, A. B. Lessar, H. Weintraub and D. Baltimore (1989). Interactions between Heterologous Helix-Loop-Helix Proteins Generate Complexes That Bind Specifically to a Common DNA Sequence. *Cell*, 5 8, 537-544
- Nemoto, Y., T. Yamamoto, S. Takada, Y. Matsui and M. Obinata (1990). Antisense RNA of the latent period gene (MER5) inhibits the differentiation of murine erythroleukemia cells. *Gene*, 9 1, 261-265
- Ohmori, Y., J. Tanabe, S. Takada, W. M. F. Lee and M. Obinata (in press). Functional domains of c-Myc involved in the commitment and differentiation of murine erythroleukemia cells. *Oncogene*
- Olson, E. N. (1990). MyoD family: a paradigm for development? *Genes & Development*, 4, 1451-1461
- Pongubala J. M. R. and M. L. Atchison (1991). Functional Characterization of Developmentally Controlled Immunoglobulin Kappa 3' Enhancer: Regulation by Id, a Repressor of Helix-Loop-Helix Transcription Factors. *M. C. B.*, 1 1, 1040-1047
- Ramsay, R. G., K. Ikeda, R. A. Rifkind and P. A. Marks (1986). Changes in gene expression associated with induced differentiation of erythroleukemia: protooncogenes, globin genes, and cell division. *P. N. A. S.*, 8 3, 6849-6853
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Shoji, W., Y. Ohmori and M. Obinata (submitted). c-Myc selectively regulates the latent period and erythroid-specific genes in murine erythroleukemia cell differentiation.
- Sun, X.-H., N. G. Copeland, N. A. Jenkins and D. Baltimore (1991). Id Proteins Id1 and Id2 Selectively Inhibit DNA Binding by One Class of Helix-Loop-Helix Proteins. *M.C.B.*, 1 1, 5603-5611
- Visvader, J., C. G. Begley and J. M. Adams (1991). Differential expression of the LYL, SCL and E2A helix-loop-helix genes within the hemopoietic system. *Oncogene*, 6, 187-194
- Weintraub, H., R. Davis, S. Tapscott, M. Thayer, M. Krause, R. Benezra, T. K. Blackwell, D. Turner, R. Rupp, S. Hollenberg, Y. Zhuang and A. Lessar (1991). The myoD Gene Family: Nodal Point During Specification of the Muscle cell Lineage. *Science*, 251, 761-766
- Wilson, R. B., M. Kiledjian, C.-P. Shen, R. Benezra, P. Zwollo, S. M. Dymecki, S. V. Kadecsh and T. Kadesch (1991). Repression of Immunoglobulin Enhancers by the Helix-Loop-Helix Protein Id: Implications for B-Lymphoid-Cell Development. *M. C. B.*, 1 1, 6185-6192

Yamamoto, T., Y. Matsui, S. Natori and M. Obinata (1989). Cloning of a housekeeping-type gene (MER5) preferentially expressed in murine erythroleukemia cells. *Gene*, 80, 337-343

